

Таблица 1

Эффективность получения жизнеспособных половинок эмбриона в зависимости от состава питательных сред.

Среда \ Показатели	Количество эмбрионов, подвергнутых делению	Получено деми-эмбрионов, %	Продолжили развитие после культивирования, п/о±п
1. Среда Дюльбекко+20% ЭС+антибиотики (контроль)	11	20-90,9	15/75,0±9,7
2. Среда Хенкса+4мг/мл БСА+антибиотики (опыт)	13	24-92,3	20/83,3±7,6
3. Среда Хекса+витамины В ₁ +В ₂ +БСА+антибиотики (опыт)	16	30-93,8	27/90,0±5,5
4. Среда Emcare (опыт)	24	47-97,9	45/95,7±3,0*

*p≤0,05

Выход жизнеспособных половинок зародышей в опытных средах был выше на 20,7 % (p≤0,05) при культивировании в первой среде, на 15,0 % – в третьей среде и 8,3 % – во второй среде по сравнению с контролем.

Вывод. Использование в культуральных средах высокомолекулярного бычьего сывороточного альбумина позволяет достоверно (p≤0,05) повысить уровень сохранности и жизнеспособности деми-эмбрионов.

Литература.

1. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova / H.R. Tervit [et al.] // J. Reprod. Fert. – 1972. – Vol. 30. – P. 493-497.
2. Barnes, D. Serum-free cell culture: a unifying approach / D. Barnes, G. Sato G. // Cell. – 1980. – Vol. 22. – P. 649-655.
3. Anderson, G.B. Advances in large mammal embryo culture. Method in mammalian reproduction // Acad. Press., N-Y., London. – 1978. – P. 273-283.
4. Transfer of culture of bovine embryos / D.F. Peters [et al.]. Theriogenology. – 1978. – Vol. 10. – N 4. – P. 337-372.

УДК 636.2.034:612.6.02

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕМИ-ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ РАЗВИТИЯ И КАЧЕСТВА ИНТАКТНОГО ЭМБРИОНА

Ю.К. КИРИКОВИЧ

РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»

Реферат. Использование ранних бластоцист отличного качества с целью получения

деми-эмбрионов позволило обеспечить их регенерационную способность после кратковременного культивирования на уровне 96,0 %, что на 12,0; 10,3 и 23,3 % выше по сравнению с бластоцистами хорошего качества, а также морулами отличного и хорошего качества.

Ключевые слова: бластоциста, деми-эмбрион деление, морула, регенерационная способность, электростатическое поле.

Введение. На современном этапе предлагается ряд способов деления ранних эмбрионов на несколько частей:

- одновременное деление клеточной массы и оболочки без размещения половин в свободной прозрачной оболочке [1, 2, 3, 4];
- деление клеточной массы внутри зоны пеллюцида с оставлением половин внутри собственной оболочки [1, 5];
- одновременное деление клеточной массы и оболочки с размещением второй части бластомеров в свободную зону пеллюцида яйцеклетки или дегенерированного эмбриона [4, 6];
- деление зоны пеллюцида пунктиром, без повреждения внутренней клеточной массы [7].

Согласно вышеизложенным способам деления, регенерационная способность полуэмбрионов после культивирования в питательной среде находится в пределах от 12,5 до 85,7 %, приживляемость деми-эмбрионов после трансплантации их реципиентам варьирует от 15,4 до 60,0%, а рождение двоен регистрируется в 20,0-45,0 % случаев. При этом указывается, что на результаты большое влияние оказывают способы деления зародышей, виды микроинструментов, стадия развития и качество интактного эмбриона, культуральные среды, режимы культивирования, способы пересадки [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8].

Тем не менее, несмотря на многочисленные практические исследования по микрохирургическому разделению ранних эмбрионов на две и более частей, многие вопросы в данной области остаются по-прежнему дискуссионными и требуют дальнейшего совершенствования используемых технологий.

В связи с этим, целью наших исследований явилось изучение влияния стадии развития и качества интактных зародышей на регенерационную способность деми-эмбрионов.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в племхозе «Литвиново» – центре трансплантации эмбрионов РСУП «Брестплемпредприятие» Кобринского района Брестской области.

Делению подвергались эмбрионы отличного и хорошего качества, имеющие правильную шарообразную форму, гомогенную светлую цитоплазму, неповреждённую, прозрачную оболочку, одинакового размера бластомеры с плотным межклеточным контактом, соответствующие по уровню дробления возрасту от оплодотворения до извлечения.

Микроманипуляции осуществляли с помощью микроманипулятора французской фирмы «IMV» марки REF-4080 и электронного манипулятора фирмы Бахофер (Германия), установленного в лаборатории и упрощённого в условиях производства в чашке Петри (Ø 40 мм) или на предметном стекле.

Для деления эмбрионов на две части использовали 2 способа: дисекцию внутренней клеточной массы (ВКМ) и оболочки стеклянной микропипеткой-иглой с оставлением половин внутри собственной оболочки и дисекцию ВКМ и оболочки ножом, изготовленным из кромки лезвия безопасной бритвы без размещения половин в свободные прозрачные оболочки.

Для ограничения подвижности поздние морулы и ранние бластоцисты отличного и хорошего качества помещали в каплю фосфатно-солевого буфера (ФБС) Дюльбекко без эмбриональной сыворотки крови, что позволяло эмбрионам под действием электростатического поля прилипнуть к чашке Петри или к предметному стеклу и не выскальзывать из-под микроинструмента. Рассечение зародышевого комплекса проводили непосредственно через зону пеллюцида в вертикальном положении на две симметричные половинки с соблюдением полярности для бластоцист. Критериями успешного деления были минимальные повреждение бластомеров.

После деления половинки помещали в чашки Петри с питательной средой и кратковременно культивировали в течение 60 минут в термостате ТС-80 при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Жизнеспособными считались половинки, у которых начинался процесс округления зародышевого комплекса.

Результаты исследований и их обсуждение. Всего было разделено 64 эмбриона и получено 107 половинок. Эффективность дисекции определяли по способности деми-эмбрионов восстанавливаться до шарообразной формы.

Проведённые исследования по определению регенерационной способности деми-эмбрионов в зависимости от качества интактных эмбрионов (см. табл.) показали, что при снижении качества как морул (85,7 против 72,7 %), так и бластоцист (96,0 против 84,0 %) уменьшается и количество жизнеспособных половинок.

Исходя из данных таблицы, видно, что стадия развития интактных зародышей оказывает существенное влияние на дальнейшее развитие полуэмбрионов. Лучшей регенерационной способностью обладают полуэмбрионы, полученные в результате деления ранних бластоцист. После их культивирования в питательной среде восстановилось 92,0% (69 из 75). После деления поздних морул восстановилось 82,6 % клеток.

Регенерационная способность demi-эмбрионов в зависимости от качества интактного эмбриона

Показатели	Стадия развития интактного эмбриона			
	Морула поздняя		Бластоциста ранняя	
Качество интактного эмбриона	Отличное	Хорошее	Отличное	Хорошее
Количество интактных эмбрионов	18	7	25	14
Получено demi-эмбрионов, п-%	35-97,2	11-78,6	50-100,0	25-89,3
Продолжили развития после культивирования, п-%	30-85,7	8-72,7	48-96,0	21-84,0

Вывод. В результате исследований установлено, что лучшей регенерационной способностью обладают ранние бластоцисты отличного качества, так как их половинки после кратковременного культивирования восстановились до 96,0 %, что выше по сравнению с морулами отличного качества, бластоцистами хорошего качества и морулами хорошего качества на 10,3; 12,0 и 23,3 % соответственно.

Литература.

1. Будевич, И.И. Методы деления эмбрионов крупного рогатого скота и эффективность их пересадки / И.И. Будевич, Н.Ф. Жук, А.И. Ганджа // Селекционно-генетические и биотехнологические проблемы разведения крупного рогатого скота: тез. докл. – Брест, 1995. – С. 5-7.
2. Будевич, И.И. Факторы, влияющие на жизнеспособность разделенных эмбрионов крупного рогатого скота / И.И. Будевич, А.И. Ганджа, Н.Ф. Жук // Зоотехническая наука Беларуси: сб. науч. тр. – Мн., 1995. – Т. 32. – С. 15-17.
3. Lopaterova, M. Možnost zvyšování superovulačního efektu u skotu transzonalním dělením embryí v hraxi / M. Lopaterova, L. Holy // Veter. Med. (Praha). – 1989. – Т. 34. – № 11. – S. 641-650.
4. Willadsen, S.M. A simple procedure for production of identical sheep twins / S.M. Willadsen, K.A. Godke // Vet. Rec. – 1984. – № 114. – P. 240-243.
5. Über die Erstellung und Entwicklung monozygoter Rinderzwillinge / A. Görlach et al. // Zuchthygiene. – 1986. – Vol. 21. – N 4. – P. 156.
6. Ozil, J.P. Production of monozygotik twins by mikromanipulation and cervikal transfer in the cow / J.P. Ozil, X. Heyman, J.P. Renard // Vet. Rec. – 1982. – Vol. 110. – № 6. – P. 126-127.
7. Skrzyszowska, M. Cattle twins after transfer of demi-embryos derived from zona-perforated blastocysts / M. Skrzyszowska, Z. Smorag // J. anim. Feed Sc. – 1999. – Vol. 8. – № 2. – P. 223-231.
8. Zhang, Yong The produktion of monozygotik goat twins by bisection embryos / Y. Zhang, J. Qian // Acta Veter. Zootechn. Sinica. – 1989. – Т. 20. – № 2. – P. 97-101.